

На правах рукописи

Борисенко Андрей Юрьевич

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ
СКРИНИНГ ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА CRISPR/CAS-СИСТЕМЫ БАКТЕРИИ**

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2021

Диссертационная работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иркутск (ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки Российской Федерации, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор **Злобин Владимир Игоревич**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии, начальник отделения препаратов бактериотерапии филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» **Несчисляев Валерий Александрович**

кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера» **Поспелова Светлана Валерьевна**

Ведущая организация:

ФКУЗ «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока». Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78)

Защита диссертации состоится _____ 2021 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: 8 (342) 2809211. E-mail: info@iegm.ru

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.minobrnauki.gov.ru>) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «ИЭГМ УрО РАН» и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

Автореферат разослан “___” _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности. Несмотря на большое число научных исследований, наличие отечественных и зарубежных антибиотических препаратов для профилактики и лечения бактериальных инфекций, в последние годы отмечается существенный рост заболеваемости, вызванной золотистым стафилококком. *Staphylococcus aureus* способен вызывать широкий спектр заболеваний - от кожных инфекций до тяжелых септических состояний с возможным летальным исходом (Ефимова и др., 2011, Nguyen *et al.*, 2017; Giulieri *et al.*, 2020). Открытие и использование в практической медицине химиотерапевтических средств и антибиотиков сыграло определяющую роль как в борьбе с инфекционными заболеваниями в течение прошлого столетия, так и формировании резистентности к антибиотикам у бактерии (Alós, 2015; Adeoye-Isijola *et al.*, 2020). Повальное и не всегда рациональное применение химиопрепаратов в клинической практике способствовало распространению устойчивых к их действию штаммов. При этом сложилась ситуация, когда необходимо дозировано подбирать несколько разных типов антибиотиков, чтобы повлиять на бактериальную инфекцию, что в свою очередь создало условия для формирования и распространения штаммов с множественной устойчивостью к широко используемым антибиотикам и химиопрепаратам (Santajit, Indrawattan, 2016). В настоящее время, согласно данным литературы, происходит рост числа циркулирующих резистентных стафилококков, являющихся причиной развития вторичных иммунодефицитов, дисбактериозов и гнойно-воспалительных заболеваний (Кочетков, 2005; Дубовец, 2011; Никулина и др., 2016; Alvarez *et al.*, 2010; David *et al.*, 2017; Kadariya *et al.*, 2014; Park, Liu, 2020).

Анализ литературы показывает, что вопросы борьбы с возбудителем разработаны недостаточно, и единственным выходом из сложившейся ситуации является повышение доз и разработка новых поколений антибиотиков для лечения инфекций, вызванных *S. aureus*. На фоне этой проблемы вновь актуальной становится фаготерапия (Lin *et al.*, 2017; Azam, Y. Tanji, 2019; Petrovic Fabijan *et al.*, 2020). Как показывают исследования препараты бактериофагов - альтернатива антибиотикам по ряду причин: фаги уничтожают бактерию, не повреждая клетки организма; прием бактериофагов не вызывает аллергии, не снижает функции иммунной системы организма; производство препаратов бактериофагов – экологически чистый процесс (Асланов, 2016, 2015; Бондаренко, 2013; Gordillo, Altamirano, 2019). Классическое определение чувствительности к бактериофагам – представляет собой длительный процесс. Перед назначением препарата бактериофага для решения вопроса о чувствительности к нему возбудителя необходимо проводить оценку литических свойств бактериофага в лабораторных условиях (Костюкевич, 2015). Современные геномные и биоинформационные технологии позволяют целенаправленно моделировать процесс отбора высокоспецифичных и вирулентных фагов против патогенных микроорганизмов на основе геномных структур CRISPR/Cas бактерий (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Аббревиатура CRISPR/Cas переводится как «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами». Посредством

CRISPR-системы бактерии распознают и эффективно расщепляют ДНК фагов, используя ферментную систему *Cas* (*CRISPR-associated*) (Barrangou *et al.*, 2015). Поиски и манипуляции с генами при помощи биоинформационных компьютерных программ открывают новый путь к изучению молекулярных процессов в генах и геномах бактерий. Такой путь имеет дополнительное преимущество при работе с микроорганизмами: он снижает вероятность развития резистентности в ходе эксперимента. Биоинформационные технологии позволяют целенаправленно моделировать процесс отбора высокоспецифичных и вирулентных фагов против микроорганизмов на основе взаимодействия CRISPR-системы (Cady *et al.*, 2012). Анализ литературы показывает, что CRISPR-система у *Staphylococcus aureus* изучена недостаточно, поскольку в научных работах говорится о разном строении и даже отсутствии CRISPR-системы у этого вида (Cao *et al.*, 2016; Xihong *et al.*, 2018). Основываясь на строении данной системы в уже изученных бактериях известно, что любая CRISPR-система имеет в своем составе гены семейства *cas* и CRISPR-кассеты (Barrangou *et al.*, 2015; Xihong *et al.*, 2018). Предполагается, что наличие определенных спейсерных последовательностей в CRISPR-кассете укажет на степень защиты бактерии от бактериофагов. Уточнение имеющихся и получение новых данных о CRISPR-системе *Staphylococcus aureus* способствовало бы решению проблем антибиотикотерапии и созданию персонализированной фаговой терапии.

Целью данной диссертационной работы является разработка алгоритма отбора вирулентных бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе молекулярно-генетических и биоинформационных технологий анализа CRISPR-системы бактерии в качестве платформы для персонифицированной фаготерапии.

Задачи исследования

1. Разработать программный алгоритм анализа CRISPR/*Cas*- системы *S. aureus* на основе современных биоинформационных инструментов.
2. Установить тип CRISPR-*Cas*-системы *S. aureus* с обнаружением спейсеров и определением источника их происхождения.
3. Сформировать коллекцию *S. aureus* с оценкой антибиотико- и фагочувствительности штаммов.
4. Осуществить поиск маркерных последовательностей с целью разработки специфических фланкирующих праймеров для CRISPR-кассет и детекции генов *cas* на основе анализа штаммов из базы данных GenBank.
5. Провести экспериментальную апробацию разработанной модели скрининга фагов на основе анализа CRISPR-кассет *S. aureus*.

Научная новизна работы. Проведено изучение и анализ CRISPR-системы в геномах *S. aureus* из базы данных Genbank и сформированной коллекции при помощи биоинформационного программного алгоритма. Установлена и продемонстрирована гетерогенность строения CRISPR-локусов у *S. aureus*. В результате, в геномах *S. aureus* обнаружены гены CRISPR-систем: I-A, II-A, III-A, IV-A, I-B. Также выявлено, участие плазмид *S. aureus* используемых в качестве дополнительных источников генов *cas* и CRISPR-кассет. Изучение степени защищенности бактерии позволило выявить CRISPR- кассеты содержащих от 1 до

15 спейсеров разделенных разными повторяющимися последовательностями. При помощи биоинформационных программ установлено, что наибольшее генетическое влияние на анализируемые штаммы *S. aureus* оказывали бактериофаги рода *Staphylococcus* - 70%, *Streptococcus* - 67%, *Mycobacterium* - 67%, *Bacillus* - 54%, *Gordonia* - 53%, *Arthrobacter* - 23%, *Streptomyces* - 12%. Обнаруженные CRISPR-касеты и гены *cas* в геномах *S. aureus* из базы данных NCBI при помощи биоинформационного программного алгоритма послужили платформой для синтеза детектирующих и фланкирующих праймеров. В результате удалось выявить наличие генов *cas* и выделить 45 CRISPR-кассет с последующим их секвенированием и оценкой устойчивости штаммов *S. aureus* к препаратам бактериофагов. Выявлено, что одна спейсерная последовательность способна защищать бактерию от разных бактериофагов.

Используемый биоинформационный алгоритм, позволил расширить представления о проблеме устройства CRISPR-системы *S. aureus* и возможности применения его для изучения CRISPR-систем в других бактериях с целью создания персонализированной фаговой терапии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость исследования заключается в целесообразности постоянного мониторинга и изучения CRISPR-системы *S. aureus*, формирования и постоянного обновления баз данных CRISPR. Представленный в работе материал является теоретической основой для совершенствования и формирования новых программных алгоритмов и методик выявления генов *cas*, повторов и спейсеров в связи со схожестью этих структур с другими функциональными генетическими единицами бактериальной клетки. Полученные результаты исследования свидетельствуют о недостаточной изученности механизмов взаимодействия CRISPR бактерий и anti-CRISPR бактериофагов и помогут обосновать новые подходы к анализу природы антагонистических взаимодействий между бактериями и фагами.

Настоящее исследование имеет выраженное прикладное значение, направленное на разработку современных методов и способов борьбы с *S. aureus*. Практическая значимость представляемого научного исследования заключена в предлагаемом методе выделения CRISPR-кассет с целью скрининга антибактериальных вирулентных фагов, которые могут стать основой создания новых высокоспецифичных и патогенных фаговых препаратов нового поколения для фаготерапии, заменив во многих случаях антибиотикотерапию в медицинской практике. Разработаны специфичные праймеры для детекции *cas*-генов и выделения CRISPR-кассет *S. aureus*. Последовательности CRISPR-кассет депонированы в международный компьютерный банк данных NCBI (Center for Biotechnology Information) GenBank №: MT542988.1; MT542987.1; MT542986.1; MT542985.1; MT542984.1. Сформирована и запатентована база данных «Спейсерные последовательности CRISPR-Cas систем штаммов *Staphylococcus aureus*» свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2021621294 от 18.06.2021 (<https://www.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=7ff99aa70a0cb122ffeff5c0d022c339>). Новые данные, полученные в

работе, могут быть применены для поиска и анализа CRISPR-систем у других видов бактерий.

Основные положения, выносимые на защиту

1. С помощью биоинформационного программного алгоритма изучена CRISPR-система *S. aureus* и выявлена гетерогенность строения этой системы у данного вида бактерий.

2. Разработаны специфичные праймеры для детекции *cas*-генов и выделения CRISPR-кассет *S. aureus*.

3. Выявлена тесная связь между антибиотикорезистентностью и устойчивостью к бактериофагам у штаммов *S. aureus*.

4. Установлено, что спейсерная последовательность CRISPR-кассеты способна защищать *S. aureus* от разных типов фагов.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Степень достоверности результатов исследования основывается на общепризнанных апробированных биоинформационных методах поиска и анализа локусов CRISPR в геномных последовательностях из баз данных и полученных ДНК клинического материала, применении современных компьютерных методов исследования, обработки информации, статистическом анализе.

Основные материалы работы были доложены и обсуждены на следующих научных форумах и конференциях: «Экология и здоровье населения» (ФГБНУ Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований. Иркутск, 2015 г.); 82-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции, посвященной 95-летию ИГМУ и 170-летию со дня рождения И.И. Мечникова «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 20-22 апреля 2015 г.); 17-ой Тихоокеанской научно-практической конференции с международным участием. (ТГМУ, г. Владивосток, 21 апреля 2016 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Природно-очаговые и другие актуальные инфекции Сибири и Дальнего Востока» (16 - 18 сентября 2015 г., г. Иркутск); Российско-Китайской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии, XVIII Кашкинские чтения (9-11 июня 2015 г., г. С-Петербург); III Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (Иркутск, 25-26 октября 2018 г.); Четвертая сессия китайско-российского симпозиума по микробиологии и борьбе с инфекционными заболеваниями (Китай, Харбинский медицинский университет, 16 июля 2021 г.) и другие.

По теме диссертации опубликовано 48 научных работ, из них 10 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора.

Диссертационное исследование поддержано грантом РФФИ и Правительством Иркутской области в рамках научного проекта №17-415-380005. Личный вклад соискателя состоит в его участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, цель и задачи, определение методологии и общей концепции диссертации разрабатывались совместно с научными руководителем заслуженным деятелем науки Российской Федерации,

академиком РАН, доктором медицинских наук, профессором Злобиным Владимиром Игоревичем. Автором лично отобраны биоинформационные программы и сформированы в алгоритм поиска и анализа CRISPR-систем бактерий; разработаны и апробированы специфические праймеры для детекции *cas*-генов и фланкирования CRISPR-кассет *S. aureus*; обобщение полученных результатов; обработка данных секвенирования, интерпретация результатов исследований; анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме CRISPR- системе *S. aureus*; написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях и докладах на конференциях.

Структура и объём диссертационной работы. Диссертация изложена на 151 страницах машинописного текста и состоит из оглавления, введения, глав «Обзор данных литературы», «Материалы и методы исследования», 3-х глав «Результаты собственных исследований», заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 17 рисунками и 14 таблицами. Список литературы содержит 373 источника, из них отечественных – 48, зарубежных – 325.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы (глава 1, 2).

В обзоре литературы представлен анализ опубликованных работ отечественных и зарубежных ученых в первой главе по вопросам биологических и клинико-эпидемиологических особенностей *S. aureus*, о роли данной бактерии в развитии различных заболеваний человека, диагностики и тяжести борьбы с данным возбудителем, а во второй главе - изучению молекулярно-генетических особенностей строения генома и системы CRISPR бактерии.

Материалы и методы исследования (глава 3)

Объекты и методы исследования

Диссертационное исследование выполнено на базе кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России в период с 2014 по 2019 г., а также микробиологические и молекулярно-генетические исследования проводили в НИИ Биомедицинских технологий ФГБОУ ВО ИГМУ, совместно с ведущим научным сотрудником НИИ БМТ ИГМУ, к.б.н. Джигоевым Юрием Павловичем; к.м.н., старшим научным сотрудником НИИ БМТ ИГМУ Степаненко Лилией Александровной; к.м.н., доцентом кафедры патологической физиологии и клинической лабораторной диагностики Карноуховой Ольгой Геннадьевной.

Объекты исследования.

Бактерии. В работе использовано 398 полногеномных последовательностей ДНК *S. aureus* из базы данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и 106 штаммов *S. aureus*, выделенных из различных биотопов (кишечник, зев, нос, эякулят) больных, обратившихся за медицинской помощью в лечебные учреждения г. Иркутска в 2015-2016 гг. на базе микробиологической лаборатории НИИ БМТ ИГМУ под руководством к.м.н. Карноуховой О.Г. Его забирали при

поступлении пациентов с соблюдением этических принципов проведения медицинских исследований, изложенных в Хельсинской декларации Всемирной организации здравоохранения (WMA Declaration of Helsinki). Забор и доставку материала осуществляли в соответствии с Приказом Минздрава СССР от 22.04.1985 г. № 535.

Антибактериальные препараты. С целью определения чувствительности штаммов к антибиотикам в работе использовались диски, пропитанные антибиотиками (производство ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера): бензилпенициллин – 10 мкг; оксациллин – 1 мкг; гентамицин – 10 мкг; эритромицин – 15 мкг; ципрофлоксацин – 5 мкг; клиндамицин – 2 мкг; офлоксацин – 5 мкг; ванкомицин – 30 мкг.

Препараты бактериофагов. У выделенных штаммов *S. aureus* определяли чувствительность к фаговым препаратам: 1) Пиобактериофаг поливалентный очищенный. Производитель: ФГУП «НПО» Микроген», Россия (г. Уфа); 2) Пиобактериофаг комплексный. Производитель: ФГУП «НПО» Микроген», Россия (г. Нижний Новгород); 3) Бактериофаг стафилококковый. Производитель: ФГУП «НПО» Микроген», Россия (г. Нижний Новгород); 4) Интести-бактериофаг. Производитель: ФГУП «НПО» Микроген», Россия (г. Нижний Новгород).

Праймеры. Используемые в работе олигонуклеотидные праймеры синтезировали в компании ООО «Биосинтез» г. Новосибирск. Представленные в таблице 1 праймеры для ПЦР были наработаны на основе проведенного анализа фланкирующих последовательностей CRISPR-кассет, обнаруженных в геномах *S. aureus* из базы GenBank, методами биоинформатики при помощи программы PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Таблица 1.

Нуклеотидные последовательности, использованные в качестве фланкирующих праймеров CRISPR-кассет

| Название пар праймеров | Структура праймера (5'→3') |
|------------------------|---|
| Primer pair 1 | F- AATCGGGTTGTTCAAGACCT R- GTTGCGTTAATGGAGAGTGCT |
| Primer pair 2 | F- TGTCACAGTTTTTGACAGCCA R- СТАТТАССГТТСТСГТССС |
| Primer pair 3 | F- AATCGGGTTGTTCAAGACCT R- GTTGCGTTAATGGAGAGTGCT |
| Primer pair 4 | F- ТТТАГГААГТАТТТТАСАТГ R- ССАГААААТТССААААСТТСА |
| Primer pair 5 | F- САСТААСТСАСТАТСААТ R- ССАТССССТАААААТААТ |

Для детекции в геномах CRISPR-системы, были синтезированы праймеры на основные гены *cas* в геномах *S. aureus*; данные праймеры представлены в таблице 2.

Нуклеотидные последовательности, использованные в качестве праймеров генов
CRISPR-системы *S. aureus*

| Название праймеров | Структура праймера (5'→3') |
|--------------------|---|
| <i>Cas 1</i> | F - АСТСАТТТСГААТССАТГТАААГС R – АААСГТГГАСГГТАСААТГА F- АГСАСТСТССАТТААСГСААС R- ТТСТТГСАГССТГТГСТТСТ |
| <i>Cas 2</i> | F - СГАГАГГТАТГТСАГСГАТГТ R – ТСГСАСААСААССТТААССТСТ F- АСГАГАГГТАТГТСАГСГАТ R- ТСГСАСААСААССТТААССТС |
| <i>Cas 6</i> | F – АГГААГТАТТТТАСАТГГТГТ R – ААССТГААААТТСГССАААС F – АГАТАГССГАГСТАТТСАСТТСТ R – ТСГАТТСААТТСССТСТГТТТСТАА |

Секвенирование фрагментов CRISPR-кассет осуществляли на базе Государственного Бюджетного Учреждения Здравоохранения "Иркутский областной онкологический диспансер" по методу Сенгера на капиллярном секвенаторе Applied Biosystems 3500.

Методы исследования.

Бактериологическое исследование. Выделение и идентификация *S. aureus* проводились в соответствии с Приказом Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», с использованием метода посева биологического материала по Голду. Количественную оценку ДНК-зной активности проводили в соответствии с рекомендациями Е.М. Гординой (2015), гемолитической – Н.Г. Ходаковой (2008).

Определение чувствительности к антибиотикам проводили Диско-диффузионным методом (ДДМ) на поверхности агара Мюллера-Хинтон в соответствии с МУК 4.2.1890-04. В качестве тестируемых препаратов использовали основные группы антибиотиков, рекомендованных соответствующими методическими указаниями (МУК, 2004) и на основании литературных данных о встречаемой устойчивости штаммов *S. aureus* к препаратам. Определение чувствительности к препаратам бактериофагов проводилось в соответствии с МУК 4.2.1890-04.

Молекулярно-генетическое исследование. Для определения принадлежности выделенных бактерий к виду *Staphylococcus aureus* использовали набор реагентов «АмплиСенс MRSA-скрин-титр-FL», предназначенный для выявления ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *S. aureus*, в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Для экстракции ДНК

использовали комплект реагентов «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия), рекомендованный ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией. Выделение ДНК проводили в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО STI-87, что позволило контролировать процедуру анализа каждого образца.

Выделенную ДНК непосредственно использовали для постановки ПЦР с детекцией в реальном времени на амплификаторе Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия). Для амплификации использовали комплект реагентов «MRSA-скрин-титр-FL» (АмплиСенс, Россия). Приготовление реакционных смесей проводили согласно инструкции к набору реагентов.

Электрофорез продуктов амплификации ДНК. Результат ПЦР-реакций с наработанными праймерами для получения фрагментов CRISPR-кассет и детекции генов *cas* подтверждали стандартным методом электрофореза в агарозном геле (Великов, 2013).

Разработка биоинформационного программного алгоритма. Поиск генов CRISPR-систем, повторяющихся последовательностей и спейсеров в расшифрованных геномных последовательностях *S. aureus* осуществляли при помощи ряда отобранных биоинформационных программ. В итоге был сформирован программный алгоритм поиска и анализа CRISPR, состоящий из ряда программ. Для поиска генов *cas*, определения их функциональных и структурных характеристик использовали три программных моделирования: *Macromolecular System Finder (MacSyF, ver. 1.0.2)*, с вспомогательными пакетами *makeblastDB (ver. 3.0)* и *HMMER (ver. 2.2.28)*, и онлайн доступных софтов: *CRISPRCasFinder* (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>) и *CRISPROne* (<https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/>). Схема идентификации CRISPR-генов, основанная на обнаружении консенсусного варианта *cas*-генов в геномах *S. aureus*, представлена на рисунке 1.

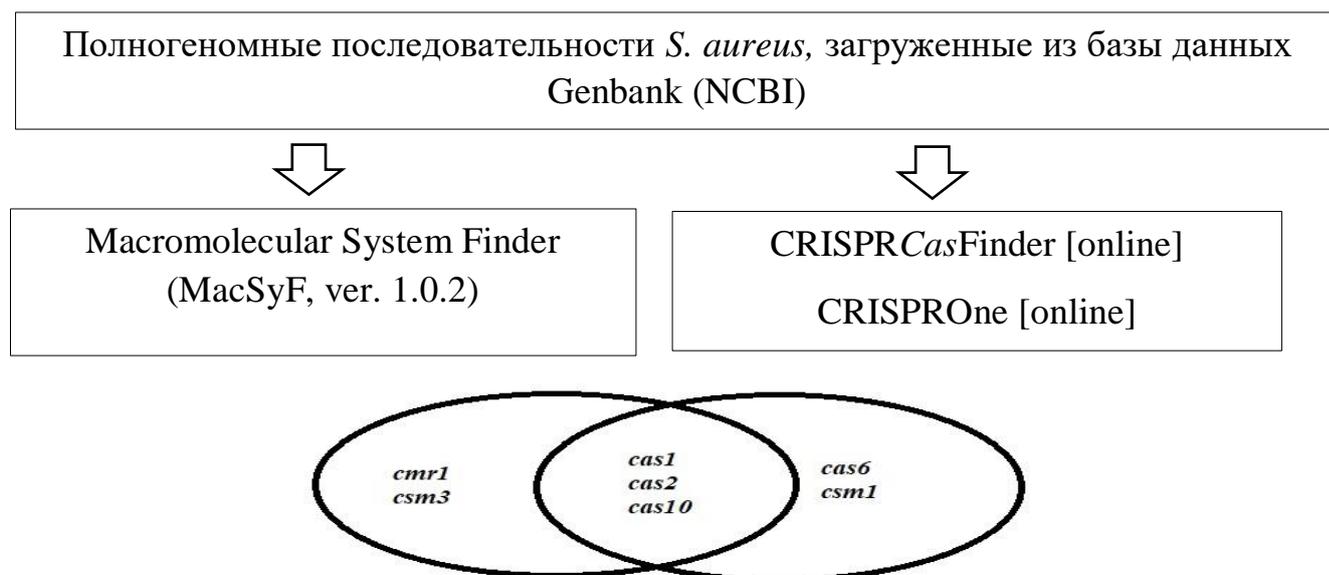


Рисунок 1. Обнаружение консенсусного варианта *cas*-генов в геномах *Staphylococcus aureus*.

Обнаружение повторяющихся последовательностей (CRISPR-кассет) осуществляли при помощи ряда программ: *CRISPR RT* (<http://www.room220.com/crt/>); *CRISPI: CRISPR-interactivedatabase* (<http://crispi.genouest.org>); *CRISPRsFinder* (<http://crispr.u-psud.fr/>); *CRISPRDetect: A flexible algorithm to define CRISPR arrays* (http://brownlabtools.otago.ac.nz/CRISPRDetect/predict_crispr_array.html), онлайн доступный софт *CRISPRCasFinder* (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>). Результаты обнаружения считались достоверными только при совпадении повторов и спейсеров в ряде программ. Для детекции бактериофагов и плазмид в обнаруженных спейсерных участках посредством биоинформационных алгоритмов BLASTn по молекулярным базам Gen_Bank-Phage использовали программы *CRISPRTarget* (http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html) и *Mycobacteriophage Database* (<http://phagesdb.org/blast/>) (рис. 2).



Рисунок 2. Идентификация повторяющихся и спейсерных последовательностей при помощи биоинформационных программ. Красным выделена область результатов совпадений программных компонентов.

Анализ секвенированных фрагментов CRISPR-кассет осуществляли при помощи программ BioEdit v. 7.0.4, Applied Biosystems Sequencing Analysis Software v. 5.3.1, Genius prime 2019, v. 2.1

Методы статистического анализа данных. Статистическую обработку и анализ математических данных производили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel, версия 7.0, STATISTICA, версия 7.0. Вычисляли средние арифметические значения, ошибки средних величин и доверительные интервалы. Достоверность различий между статистическими параметрами определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Корреляционный анализ с целью изучения связи

между чувствительностью / устойчивостью к антибиотикам и бактериофагам проведен с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена (Шелудько, 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика устойчивости выделенных от больных штаммов *Staphylococcus aureus* к действию антибиотиков и бактериофагов (глава 4).

Исследование антибиотикорезистентности 106 штаммов *S. aureus* позволило выявить высокий удельный вес резистентных культур для исследуемых антибиотиков. Результаты исследования показали, что к антибиотикам группы пенициллинов - бензилпеницилину и его полусинтетическому аналогу оксацилину, резистентность *S. aureus* составляла $32,1 \pm 4,5\%$ и $12,3 \pm 3,2\%$ соответственно. Чуть выше была резистентность к представителю первого поколения ряда макролидов - эритромицину, которая составляла $15 \pm 3,5\%$. Анализ резистентности штаммов к препарату группы гликопептидов - ванкомицину показал, что устойчивыми были $3,8 \pm 1,9\%$ исследованных изолятов. К препаратам фторхинолонов второго поколения отмечался столь же высокий уровень чувствительности: для ципрофлоксацина резистентность оказалась равна $2,8 \pm 1,6\%$, а для офлоксацина - $1,9 \pm 1,3\%$. Точно такой же уровень резистентности показал анализ и для линкозамидов, а именно клиндамицина - $1,9 \pm 1,3\%$. Наименьший уровень резистентности наблюдался для представителя группы аминогликозидов гентамицина, к которому оказались нечувствительны лишь $0,9 \pm 0,9\%$ исследованных штаммов.

Исследование устойчивости штаммов к препаратам бактериофагов проводимые в соответствии с МУК 4.2.1890-04 позволили выявить максимальный уровень резистентности для стафилококкового бактериофага - $55,6 \pm 4,8\%$. Резистентность к интести-бактериофагу составляла $43,4 \pm 4,8\%$, к пиобактериофагу поливалентному очищенному - $42,5 \pm 4,8\%$. Наименьшую резистентность изоляты показали к пиобактериофагу комплексному, к которому устойчивыми оказались $39,6 \pm 4,7\%$ штаммов.

С целью изучения тесноты связи между антибиотикорезистентностью и устойчивостью к бактериофагам была проведена сравнительная оценка штаммов по выборочному линейному коэффициенту корреляции (Таблица 3).

Таблица 3.

Сводная таблица частоты устойчивых (R) и чувствительных (S) к антибиотикам стафилококков и устойчивых (R) и чувствительных (S) к бактериофагам штаммов стафилококков и корреляции (r) между чувствительностью - устойчивостью к антибиотикам и бактериофагам (%).

| Бактериофаг и | | Антибиотики | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|---|-------------|----------|----------|----------|--------|--------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|---|
| | | Пен | | Окс | | Эри | | Ван | | Цип | | Офл | | Кл | | Ген | | |
| | | S | R | S | R | S | R | S | R | S | R | S | R | S | R | | | |
| | % | 67, 9 | 32, 1 | 87, 7 | 12, 3 | 8 5 | 1 5 | 96, 2 | 3, 8 | 97, 2 | 2, 8 | 98, 1 | 1, 9 | 98, 1 | 1, 9 | 99, 1 | 0, 9 | % |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | S | 63,1 | 0,9 | 0,88 | 0,89 | 0,83 | 0,82 | 0,82 | 0,82 | 0,81 | Коэффициент | | | |
| | R | 39,6 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | S | 44,4 | 0,73 | 0,44 | 0,47 | 0,35 | 0,35 | 0,34 | 0,34 | 0,33 | | Коэффициент | | |
| | R | 55,6 | | | | | | | | | | | | |
| 3 | S | 56,6 | 0,9 | 0,77 | 0,64 | 0,71 | 0,53 | 0,52 | 0,52 | 0,52 | | | Коэффициент | |
| | R | 43,4 | | | | | | | | | | | | |
| 4 | S | 57,2 | 0,9 | 0,78 | 0,81 | 0,73 | 0,72 | 0,71 | 0,71 | 0,70 | | | | Коэффициент |
| | R | 42,5 | | | | | | | | | | | | |

Примечание: S (*susceptible*) - чувствительные микроорганизмы; R (*resistant*) - резистентные микроорганизмы; окс - оксациллин, ван - ванкомицин, пен - бензилпенициллин ген - гентамицин, эри - эритромицин, цип - ципрофлоксацин, кл - клиндамицин, офл - офлоксацин, 1 - комплексный пиобактериофаг, 2 - стафилококковый бактериофаг, 3 - интести- бактериофаг, 4 - поливалентный очищенный бактериофаг.

Отсутствие взаимосвязи между множественной устойчивостью к бактериофагам и антибиотикорезистентностью подтверждается отсутствием статистически достоверной корреляции ($p > 0,05$). Однако при анализе показателей чувствительности стафилококков в отношении отдельных антибиотиков и бактериофагов была выявлена связь у анализируемых штаммов. Полученные коэффициенты, сопоставленные со шкалой Чеддока, указали на высокую ($0,7 < r < 0,9$) тесноту связи между стафилококковым бактериофагом и пенициллином ($r = 0,73$) и на умеренную ($0,3 < r < 0,5$) тесноту связи между стафилококковым бактериофагом (№ 2) и остальными антибиотиками. В большинстве случаев полученный коэффициент свидетельствует о высокой связи исследуемых признаков. Так, среди всех стафилококков, чувствительных к комплексному пиобактериофагу и анализируемым антибиотикам, выявлена прямая статистически значимая корреляционная связь высокой силы $r = 0,9$ (для пенициллина и остальных), $p < 0,05$. Для интести-бактериофага высокая статистически значимая связь определена для пенициллина ($r = 0,9$), заметная теснота связи ($0,5 < r < 0,7$) оказалась характерной для всех остальных антибиотиков. Для поливалентного очищенного бактериофага также оказалась характерной высокая либо заметная связь для большинства антибиотиков. На основании полученных результатов выявлена прямая тесная связь между антибиотикорезистентностью и устойчивостью к бактериофагам у анализируемых штаммов. Результаты изучения устойчивости штаммов к антибиотическим и бактериофаговым препаратам показали высокую комплексную резистентность и приспособляемость бактерий.

Молекулярно-генетическое и биоинформационное исследование CRISPR/Cas-системы в штаммах *S. aureus* (глава 5).

Основой для исследования послужили работы, направленные на изучение CRISPR/Cas-системы в разных бактериях, например, *Escherichia coli* (Diez-Villasenor *et al.*, 2013), *Yersinia pestis* (Vergraud *et al.*, 2007), *Yersinia pseudotuberculosis* (Koskela *et al.*, 2015), *Streptococcus pyogenes* (Koo *et al.*, 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Cady *et al.*, 2012). Впервые возможность использования нескольких биоинформационных программных инструментов для поиска и анализа

CRISPR-системы была показана в 2018 году на 38 штаммах *S. aureus* (Zhao *et al.*, 2018).

В результате поиска генов *cas* в 398 штаммах *S. aureus* из базы данных GenBank была получена информация о неоднородности CRISPR-системы внутри вида. Разнообразие строения CRISPR у *S. aureus* подтверждена обнаружением разных классов генов *cas*. На основе результатов исследования все штаммы были разделены на 5 групп с разным типом строения CRISPR-локуса.

В первую группу вошли 2 штамма (CP030403.1; AP020315.1) с обнаруженной CRISPR - системой типа III-A. Вторую группу дополнили интересные, на наш взгляд 7 штаммов, причем 5 штаммов (CP029653.1; CP058615.1; CP060491.1; CP012756.1; CP029649.1; CP029681.1; CP003808.1), содержащих два типа CRISPR-системы с собственными кассетами, расположенными на расстоянии друг от друга. Пример обнаружения двух типов CRISPR представлен на рис. 3.

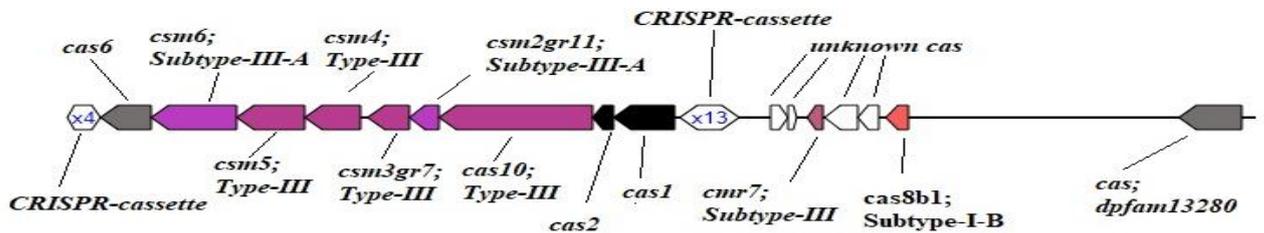


Рисунок 3. Строение CRISPR-системы в геноме *S. aureus* (CP029649.1) обнаруженное при помощи онлайн софта CRISPRone и Macromolecular System Finder (ver. 1.0.2).

В результате были идентифицированы гены типа III-A, включающие *cas1*, *cas2*, *cas10*, *csm2*, *csm3*, *csm4*, *csm5*, *csm6* и гены, характерные для I-B типа *cas8b1* и *cmr7*. И два штамма (CP058615.1; CP029653.1) содержащих помимо вышеперечисленных генов, еще *casR* и *csa3* – I-A типа (Рис. 4).

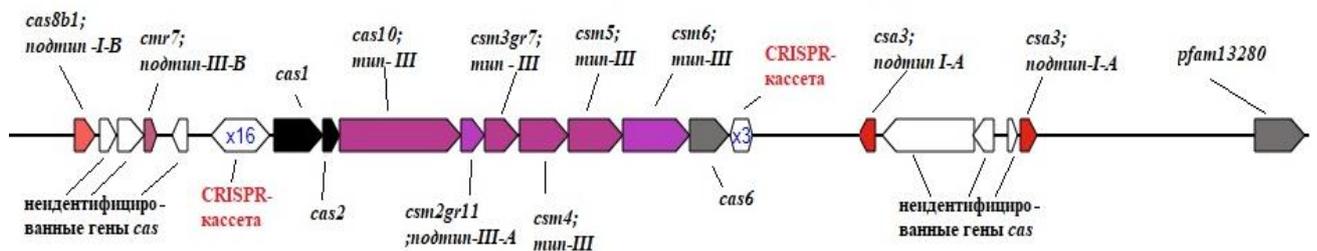


Рисунок 4. Строение CRISPR-системы в геноме *S. aureus* (CP058615.1) обнаруженное при помощи онлайн софта CRISPRone и Macromolecular System Finder (ver. 1.0.2).

По всей видимости, наличие двух и более разных систем в геноме штамма стафилококка является результатом многочисленных перекрестов генов, увеличением давления профагов и учащенного плазмидного обмена между бактериями (Crowley *et al.*, 2019). Процесс трансдукции у бактерий продемонстрирован (Watson *et al.*, 2018) между штаммами *Pectobacterium atrosepticum*, где бактериофаги переносили всю хромосомную систему CRISPR,

включая гены *cas* и фаг-нацеленные спейсеры. По всей видимости, процессы трансдукции затронули и штаммы, которые были отнесены нами к третьей группе, включающей 5 штаммов (AP019751.1; CP013621.1; CP053354.1; CP031673.1; CP047799.1), по причине обнаружения в геномах фрагментов *casR* и *csa3* - I типа. Причем, генов *cas* типа III-A и I-B в группе 2 не было обнаружено. Пример идентифицированного I - типа CRISPR представлен на рисунке 5.

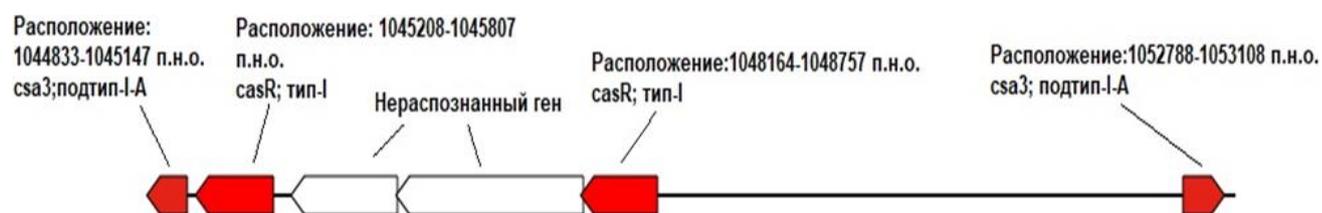


Рисунок 5. Строение I - типа CRISPR в геноме *S. aureus* RIVM3897 (CP013621.1), идентифицированное при помощи онлайн софта CRISPRone и Macromolecular System Finder (ver. 1.0.2).

В четвертую группу вошли 3 штамма золотистого стафилококка (CP065857.1; CP023500.1; CP006706.1) содержащих от 4 до 5 генов I- типа и подтипа IV-A и один штамм под номером № CP030138.1 содержащий 7 генов (III и II-A типа): *csx1*, *csa3* и ген *cas9*, не встречающийся в других штаммах (рис. 6).



Рисунок 6. Строение CRISPR-системы II-A типа CRISPR в геноме *S. aureus* M48 (CP030138.1), идентифицированное при помощи онлайн софта CRISPRone и MacromolecularSystemFinder (ver. 1.0.2).

И в пятую группу были отнесены 206 штаммов либо не содержащих генов *cas*, либо имеющих остаточные фрагменты локусов CRISPR. В связи с обнаружением генов *cas* в ряде штаммов с отсутствующими кассетами в геномах было принято решение поиска локусов CRISPR в плазмидах *S. aureus*, нуклеотидные последовательности которых доступны в базе NCBI.

В результате анализа плазмидного профиля золотистого стафилококка было выяснено, что плазмиды также могут содержать гены *cas*, как полные, так и фрагменты. Единственным отличием являлось их расположение в плазмиде и окружение неизвестными профилями других генов, которых программы характеризовали как «неизвестные *cas*». По всей видимости, идентификация подобных генов на сегодняшний день затруднена по причине малой изученности. Всего было проанализировано 442 плазмиды, гены субтипа I-A присутствовали в

21 плазмиде из которых 8 программы идентифицировали, как полнолокусными типа I-A.

В результате биоинформационного анализа генов нами была выявлена и продемонстрирована гетерогенность строения CRISPR-локусов у *S. aureus*.

Обнаружение повторяющихся последовательностей как маркеров CRISPR-кассет осуществляли при помощи ряда программ (Глава 3). Число обнаруженных нами спейсерных последовательностей в каждом локусе CRISPR было между 1 и 15. Длина спейсерных последовательностей была сконцентрирована в 26-35 п.н.о., а длина повторяющихся последовательностей была сконцентрирована в пределах 25-32 п.н.о. Выяснено, что нуклеотидная последовательность повторов CRISPR-кассет была разной, это явление мы объясняем наличием разных типов CRISPR, для которых характерна собственная присущая им последовательность.

Интересными на наш взгляд, являются полученные результаты анализа генома штаммов золотистого стафилококка с выделенными плазмидами. Выяснено, что плазмиды с обнаруженными нами генами *cas* по всей видимости способны формировать CRISPR-кассеты в собственном геноме бактерии и наоборот организовывать их в плазмидах, минуя геном. Так, например, в плазмиде штамма *S. aureus* ATCC 6538 (CP020021.1) обнаружены гены *cas* подтипа I-A, а в геноме бактерии (CP020020.1) была обнаружена CRISPR-кассета, включающая три спейсерных последовательности.

Идентификация спейсерных участков, соответствующих протоспейсерам бактериофагов, позволила определить и выявить видовую устойчивость штаммов к специфичным бактериофагам в анализируемых штаммах *S. aureus* из базы Genbank и выявить, что наибольшее генетическое влияние на штаммы оказывали бактериофаги рода *Staphylococcus* - 70%, *Streptococcus* - 67%, *Mycobacterium* - 67%, *Bacillus* - 54%, *Gordonia* - 53%, *Arthrobacter* - 23%, *Streptomyces* - 12%.

Таким образом, при помощи разработанного биоинформационного программного алгоритма была получена новая информация о строении CRISPR-системы *S. aureus*. Были обнаружены гены *cas*, получены их структурные и функциональные характеристики, идентифицированы CRISPR-кассеты и проанализирована фаговая устойчивость каждого штамма. В связи с возникающими трудностями анализа геномов из-за накапливающихся ограничений и несоответствий в классификации и номенклатуре CRISPR-систем нами выдвинуто предложение о необходимости периодического мониторинга данной системы у бактерий. С точки зрения борьбы с возбудителями бактериальных инфекций с целью формирования эффективной фаговой терапии, проведенная биоинформационная работа позволила наработать праймеры для идентификации CRISPR-кассет с последующим их секвенированием, результаты практической работы которой представлены в главе 6.

Экспериментальная апробация разработанной модели алгоритма молекулярно-генетического и биоинформационного скрининга бактериофагов на основе изучения CRISPR-кассет в CRISPR/Cas-системах бактерий (глава 6).

Недостаточная изученность CRISPR-систем обуславливает сложности их обнаружения, так как механизмы поиска опираются только на известные гены, повторы, лидерные последовательности и т. д. Несмотря на это, нами было продемонстрировано в главе 5 биоинформационное исследование, в результате которого были получены данные о разнородности системы у стафилококка. Установлено, что уровень развития CRISPR-систем у одного вида бактерии чрезвычайно высок, о чем свидетельствует обнаружение разных типов генов *cas*. Дальнейшие наши исследования были направлены на получение специфических праймеров к обнаруженным CRISPR-кассетам, поскольку данная работа посвящена разработке персонализированной фаговой терапии заболеваний вызываемых *S. aureus*.

С целью выделения фрагментов CRISPR-кассет и детекции *cas1*, *cas2* и *cas6* генов осуществляли ПЦР реакции с наработанными праймерами (глава 3) и подтверждали стандартным методом электрофореза в агарозном геле. Пример детекции CRISPR генов представлен на рисунке 7.

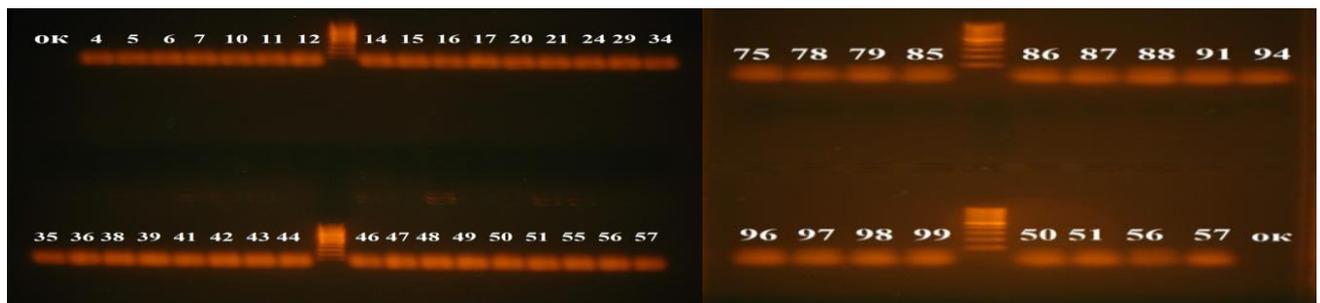


Рисунок 7. Агарозный гель-электрофорез образцов ДНК CRISPR-генов *S. aureus*. Слева – *cas1*. Справа – *cas2*.

Результаты секвенирования 208 фрагментов ДНК, предположительно относящихся к CRISPR-кассетам, анализировали при помощи разработанного биоинформационного алгоритма. Параметры поиска повторов и спейсера выбирали стандартные, за исключением количественного состава спейсеров. На основании результатов исследования в главе 5 было принято решение осуществлять поиск одной и более спейсерных последовательностей в кассете. Всего было получено 45 CRISPR-кассет. Повторяющаяся последовательность длиной 27 п.н.о. представлена на рисунке 8.

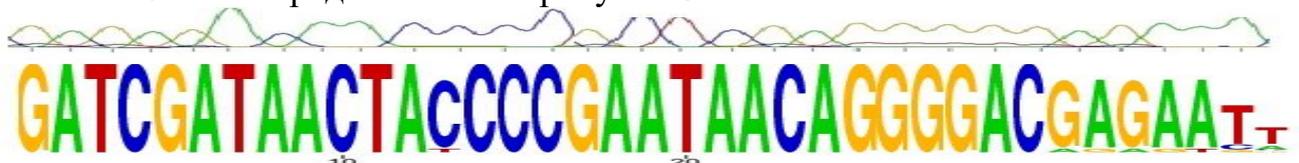


Рисунок 8. Хроматограмма расшифрованной повторяющейся последовательности в CRISPR-кассетах *S. aureus*, визуализированная в программе Genius prime 2019, версия 2.1

CRISPR-кассеты, обнаруженные в геноме *S. aureus*, были небольших размеров и содержали от 1 до 5 спейсеров размером 34 н. о. Малое содержание спейсеров в кассетах стафилококка описывалось нами ранее в главе 5. В результате было выяснено, что 18 штаммов содержали 1 спейсерную последовательность, 10 штаммов включали лишь 2 спейсерные последовательности, 9 штаммов - три спейсера, у 6 штаммов обнаружено четыре спейсера и всего лишь 2 штамма отличились наличием 5 спейсерными последовательностями (табл. 4).

Таблица 4.

Спейсерные последовательности, обнаруженные в штаммах *S. aureus*

| № штамма | Спейсерная последовательность |
|---|--|
| 5, 7, 9, 12, 14, 23, 38, 39, 41, 42, 47, 48, 51, 66, 77, 78, 85, 99 | AATATAAACCCGTTCAATTCGTTATCTTTAAATTCTTG |
| 56, 58, 62, 64, 74, 80, 82, 83, 97, 100 | ATAAACCCGTTCAATTCGTTATCTTTAAATTCTTG |
| | ACCACCGATCTGCGCCAGCTGGGTGAGACGATGAC |
| 27, 28, 29, 30, 33, 35, 43, 45, 49 | ATAAACCCGTTCAATTCGTTATCTTTAAATTCTTG |
| | ACCACCGATCTGCGCCAGCTGGGTGAGACGATGAC |
| | ACCGACGGGGCAGGTTTACGTCTACCCGGGCAGGG |
| 3, 17, 19, 20, 24, 26 | ATAAACCCGTTCAATTCGTTATCTTTAAATTCTTG |
| | ACCACCGATCTGCGCCAGCTGGGTGAGACGATGAC |
| | ACCGACGGGGCAGGTTTACGTCTACCCGGGCAGGG |
| | ACCATACCAGTCTCCGCCGCGGTCGTACTCAATAT |
| 4,11 | AAACCCGTTCAATTCGTTATCTTTAAATTCTTG |
| | CACCGATCTGCGCCAGCTGGGTGAGACGATGAC |
| | CGACGGGGCAGGTTTACGTCTACCCGGGCAGGG |
| | CATACCAGTCTCCGCCGCGGTCGTACTCAATAT |
| | TCCGCCGTTTAATCGCGGTGATGATATCCGGCA |

Исследование нуклеотидного профиля спейсерных последовательностей с протоспейсерами бактериофагов в обнаруженных кассетах позволило выявить одинаковые CRISPR-кассеты отличающихся только добавлением нового спейсера. Часть спейсерных последовательностей, например 3 и 4 кодировали защиту от одного и того же фага, *Arthrobacter phage*. Подобные структуры спейсеров не позволяют фагу преодолеть защиту бактерии с помощью точечных мутаций.

Усиление нашего внимания к оценке гомологии спейсеров и протоспейсерных последовательностей бактериофагов способствовало обнаружению разных протоспейсеров в каждой анализируемой спейсерной последовательности. Так, например, спейсерная последовательность:

ACCACCGATCTGCGCCAGCTGGGTGAGACGATGAC всех штаммов совпадала с разными последовательностями протоспейсеров фагов: *Mycobacterium phage*, *Gordonia phage*, *Streptomyces phage* и т. д. (рис. 9).

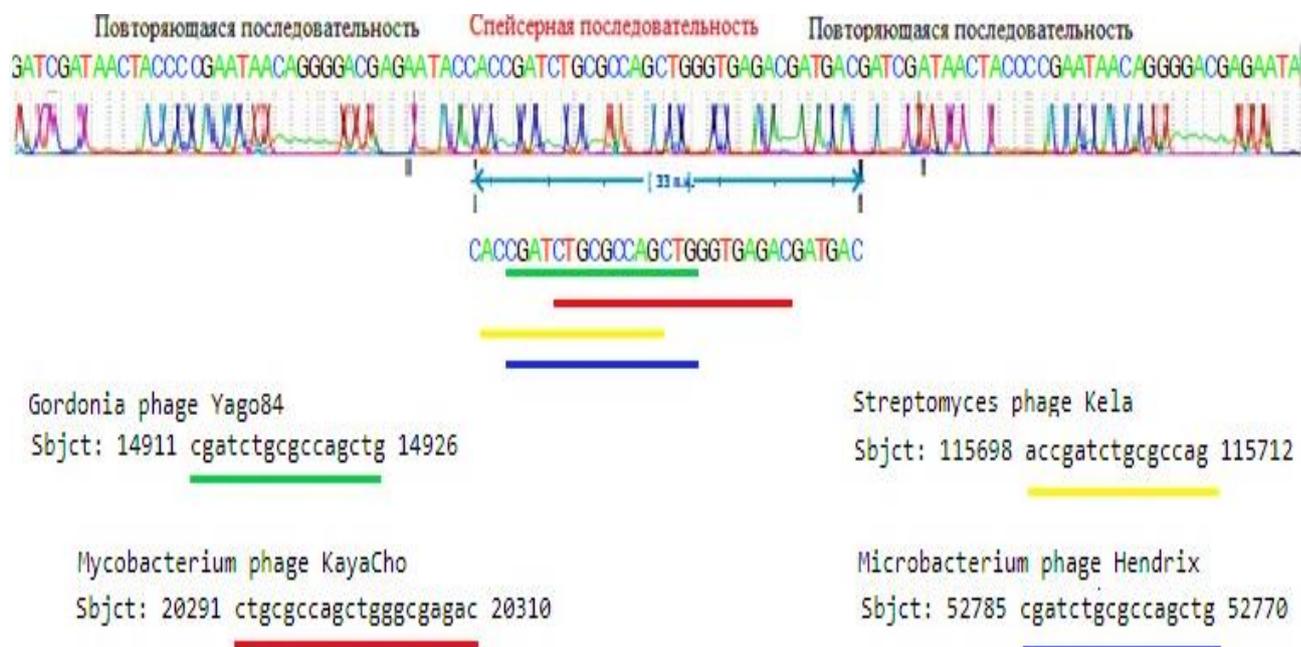


Рисунок 9. Биоинформационный анализ спейсерной последовательности

Данная информация была получена для каждого спейсера (табл. 5).

Таблица 5.

Нуклеотидное совпадение спейсерных последовательностей с протоспейсерами бактериофагов

| Спейсерная последовательность | Совпадение н.о. | Бактериофаг из баз данных |
|--|-----------------|-------------------------------------|
| AATATAAACCCGTTCAATTCGTTAT CTTTAAATTCTTG | - | Не идентифицированный бактериофаг |
| ACACCGATCTGCGCCAGCTGGGTG AGACGATGAC | 16 | <i>Gordonia phage Yago84</i> |
| | 19 | <i>Mycobacterium phage KayaCho</i> |
| | 16 | <i>Microbacterium phage Hendrix</i> |
| | 15 | <i>Streptomyces phage Whatever</i> |
| ACCGACGGGGCAGGTTTACGTCTA CCCGGGCAGGG | 15 | <i>Arthrobacter phage Yeezus</i> |
| | 11 | <i>Gordonia phage Tangerine</i> |
| ACCATACCAGTCTCCGCCGCGGTC GТАCTCAATAT | 16 | <i>Microbacterium phage Kozie</i> |
| | 15 | <i>Arthrobacter phage Wilde</i> |
| | 15 | <i>Microbacterium phage Tyumbra</i> |

| | | |
|---------------------------------------|----|--|
| | 15 | <i>Propionibacterium phage SKKY</i> |
| | 15 | <i>Corynebacterium phage Juicebox</i> |
| TCCGCCGTTTAATCGCGGTGATGAT ATCCGGCA | 16 | <i>Microbacterium phage Neferthena</i> |
| | 15 | <i>Mycobacterium phage Waterfoul</i> |
| | 15 | <i>Gordonia phage Morrissey</i> |
| | 15 | <i>Gordonia phage Gustav</i> |

Должно полагать, что полученный результат анализа спейсерных последовательностей CRISPR-кассет является доказательством того, что протоспейсерами выступают не случайные последовательности, а участки, отобранные в результате эволюционных взаимодействий CRISPR-системы *S. aureus* с бактериофагами, поскольку, как видно из таблицы 6, отличия в 1–2 нуклеотида в спейсерах определяются программами протоспейсеров разных бактериофагов. В связи с этим мы считаем, что подбор препаратов бактериофагов необходимо осуществлять с учетом филогенетических методов анализа генома бактериофагов совместно со спейсерными последовательностями бактерии. Обращает на себя внимание тот факт, что использование препаратов бактериофагов с протоспейсерами, комплементарными спейсерам, способствует некомпетентному лечению и выработке у штаммов дополнительных спейсеров.

Таким образом, в результате сопоставления показателей чувствительности к препаратам бактериофагов данных штаммов к полученным наборам CRISPR-кассет, выявлено, что штаммы с CRISPR-кассетами проявляют разную степень устойчивости к препаратам бактериофагов. В таблице № 9 (глава 4.2) демонстрируется устойчивость штаммов к лизатам препаратов фагов. Отмечается, что штаммы с большим содержанием спейсерных последовательностей (4,5 спейсера) проявляли устойчивость ко всем 4 препаратам бактериофагов, штаммы с 1 и 2 спейсерными последовательностями проявляли резистентность к одному или двум препаратам. В работе Cooper *et al.* в 2018 году было продемонстрировано, что для связывания комплекса *Cascade* с ДНК-мишенью достаточно всего 5 н.о. в системе I-E типа в геноме *Escherichia coli*. В связи с этим на данный момент времени трудно определить конкретное число пар нуклеотидов, необходимое для узнавания чужеродной ДНК в CRISPR-системе у *S. aureus*, этот факт, безусловно, затрудняет определение источника спейсера. На основании вышеизложенного, подбор лечебного фага необходимо осуществлять, основываясь на полном отсутствии комплементарности между нуклеотидами спейсерных последовательностей и геномом бактериофагов. Дальнейший поиск и всестороннее изучение CRISPR-системы как внутри генома, так и в плазмидах *S. aureus* с совершенствованием биоинформационных инструментов и алгоритмов представляется чрезвычайно важным с точки зрения определения течения заболевания и выбора тактики лечения больного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для получения данных, связанных со строением CRISPR-системы стафилококка, нами был сформирован алгоритм, состоящий из ряда

биоинформационных программ. Программы, используемые в данном алгоритме, позволяли получать информацию о наличии в геноме *cas*-генов, CRISPR-кассет и определять принадлежность спейсерных последовательностей к протоспейсерным последовательностям фагов. При помощи биоинформационного алгоритма в 398 геномах штаммов *S. aureus* из базы данных GenBank нами была выявлена и продемонстрирована гетерогенность строения CRISPR-локусов у *S. aureus*. В результате, в геномах *S. aureus* обнаружено присутствие генов CRISPR-систем: I-A, II-A, III-A, IV-A, I-B. На основании анализа плазмидного профиля золотистого стафилококка было выяснено, что плазмиды также могут содержать гены *cas* и CRISPR-кассеты.

Установлено, что 160 штаммов *S. aureus* содержали только одну CRISPR-кассету, а 46 штаммов включали по 2 CRISPR-кассеты. С большой долей вероятности можно предположить, что плазмиды с обнаруженными нами генами *cas* способны формировать CRISPR-кассеты в собственном геноме бактерии. В то же время CRISPR-кассеты могут формироваться в плаزمиде, минуя геном. Число обнаруженных нами спейсерных последовательностей в каждом локусе CRISPR было между 1 и 15. Причем, повторяющиеся последовательности нуклеотидов были разными. Это явление мы объясняем наличием разных типов CRISPR, для которых характерна собственная присущая им последовательность. Идентификация спейсерных участков, соответствующих протоспейсерам бактериофагов, позволила определить и выявить видовую устойчивость штаммов к специфичным бактериофагам. Результаты анализа показателей устойчивости штаммов к антибиотическим и бактериофаговым препаратам показали высокую комплексную резистентность и приспособляемость золотистого стафилококка. Это обстоятельство еще раз подчеркивало существующие сложности борьбы со стафилококковыми инфекциями и настоятельную необходимость поиска новых эффективных подходов к профилактике и лечению данных заболеваний. В упомянутом аспекте значительный интерес представляет собой разработка персонифицированной фаговой терапии.

Обнаруженные ранее CRISPR-кассеты в геномах *S. aureus* послужили платформой для синтеза фланкирующих праймеров, апрабация которых осуществлялась на сформированной нами коллекции штаммов. В результате было выделено и расшифровано 45 CRISPR-кассет небольших размеров, содержащих от 1 до 5 спейсеров размером 34 п.н.о. Усиление нашего внимания к оценке гомологии спейсеров и протоспейсерных последовательностей бактериофагов способствовало обнаружению нескольких протоспейсеров в спейсерных последовательностях *S. aureus*. На наш взгляд, полученный результат анализа спейсерных последовательностей CRISPR-кассет, является доказательством того, что протоспейсерами выступали не случайные последовательности, а участки, отобранные в результате эволюционных взаимодействий CRISPR-системы *S. aureus* с бактериофагами. Разница в 1–2 нуклеотида в спейсерах определялись программами протоспейсеров разных бактериофагов. Этот факт, безусловно, затрудняет определение источника спейсера. В результате сопоставления показателей чувствительности к препаратам бактериофагов данных штаммов к

полученным набором CRISPR-кассет, выявлено, что все штаммы с CRISPR-кассетами проявляют разную степень устойчивости к препаратам бактериофагов. Отмечено, что штаммы с большим содержанием спейсерных последовательностей (4, 5 спейсеров) проявляли устойчивость ко всем 4 препаратам бактериофагов, штаммы с 1 и 2 спейсерными последовательностями проявляли резистентность к одному или двум препаратам. На основании вышеизложенного, мы полагаем, что подбор лечебного фага необходимо осуществлять, основываясь на отсутствии комплементарности между нуклеотидами спейсерных последовательностей и геномами бактериофагов.

Используя данные, полученные на представителях рода *Staphylococcus* в качестве модели, в будущем может быть сформирована платформа для таргетной фаговой терапии других инфекционных заболеваний. Новая система высокоинформативной генетической лабораторной диагностики фагорезистентности бактерий будет сформирована на основе наличия или отсутствия у них той или иной CRISPR-системы. В дальнейшем по данным этих исследований будет создаваться банк данных структурного разнообразия сайтов CRISPR/*Cas*-систем стафилококков и баз данных разнообразия бактериофагов, что даст новые возможности эффективной терапии бактериальных инфекций в условиях нарастания антибиотикоустойчивости микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. Сформирован алгоритм для поиска и анализа CRISPR/*Cas*-систем в геномах бактерий из биоинформационных молекулярно-генетических программ.

2. Обнаружено присутствие генов CRISPR-систем: I-A, II-A, III-A, IV-A, I-B в геномах *S. aureus*. Плазмиды бактерии также могут содержать гены *cas* и CRISPR-касеты.

3. Выявлена межвидовая устойчивость штаммов к бактериофагам на основе анализа спейсерных последовательностей.

4. Разработаны специфичные праймеры для детекции генов *cas* и фланкирования CRISPR-кассет *S. aureus* на основе результатов анализа геномов бактерии, полученных при помощи биоинформационного программного алгоритма.

5. Анализ CRISPR-кассет коллекционных штаммов *S. aureus*, полученных благодаря разработанным праймерам, совместно с определением чувствительности штаммов к препаратам бактериофагов, показал, что одна спейсерная последовательность способна защищать бактерию от разных видов фагов.

6. У штаммов *S. aureus* из сформированной коллекции выявлена прямая статистически значимая связь весьма высокой величины между антибиотикорезистентностью и устойчивостью к препаратам бактериофагов.

7. Разработанный биоинформационный алгоритм, расширяет представления о проблеме устройства CRISPR-системы *S. aureus* и может служить платформой для создания персонализированной фаготерапии стафилококковых и других видов возбудителей бактериальных инфекций.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации:**

1. **Борисенко А.Ю.** Использование биоинформационных программных методов для поиска CRISPR/CAS систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus* / **А.Ю. Борисенко**, Ю.П. Джигоев, А.И. Парамонов, Ю.С. Букин, Л.А. Степаненко, О.В. Колбасеева, В.И. Злобин // **Сибирский медицинский журнал**. – 2015. – Т. 133. – №2. – С. 71–74.
2. Перетолчина Н.П. Биоинформационный поиск и скрининг фагов и плазмид через спейсерные сайты CRISPR/CAS- системы штамма *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* YPIII / Н.П. Перетолчина, Ю.П. Джигоев, **А.Ю. Борисенко**, А.И. Парамонов, Е.А. Воскресенская, Л.А. Степаненко, Н.Е. Зелинская, О.В. Колбасеева, Н.В. Шмидт, В.И. Злобин // **Сибирский медицинский журнал** (Иркутск). – 2015. – Т. 138. – № 7. – С. 63–68.
3. Перетолчина Н.П. Биоинформационный анализ CRISPR/CAS системы штамма *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* IP32953 / Н.П. Перетолчина, Ю.П. Джигоев, **А.Ю. Борисенко**, Е.А. Воскресенская, А.И. Парамонов, Л.А. Степаненко, О.В. Колбасеева, В.И. Злобин // **Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук**. -2016. -Т. 1, № 5 (111). – С. 64–67.
4. **Борисенко А.Ю.** Биоинформационные алгоритмы поиска и анализа CRISPR/Cas систем и фаговых профилей в геноме штамма *Staphylococcus aureus* M1216 / **А.Ю. Борисенко**, Ю.П. Джигоев, Н.П. Перетолчина, В.И. Злобин, Е.А. Воскресенская, Л.А. Степаненко, Н.Е. Зелинская, О.В. Колбасеева, Н.В. Шмидт, И.В. Малов // **Материалы IV конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням**. Санкт-Петербург, 18-20 мая 2016. **Журнал Инфектологии**. – 2016. – Т. 8. – №8. – С. 27–28.
5. **Борисенко А.Ю.** Поиск и анализ CRISPR/CAS- систем и фаговых ассоциаций через спейсеры CRISPR- кассет в геномах *Staphylococcus aureus* методами биоинформатики / **А.Ю. Борисенко**, Ю.П. Джигоев, В.И. Злобин, Н.П. Перетолчина, А.И. Парамонов, Л.А. Степаненко, О.В. Колбасеева, Н.Е. Гаращенко, К.А. Гусевская, В.А. Кузьминова // **Журнал инфектологии**. – 2017. –Т. 9. – № S2. – С. 33.
6. **Борисенко А.Ю.** Биоинформационный поиск и анализ структур CRISPR/Cas-систем в геноме штамма *Staphylococcus aureus* и оценка профилей фаговых рас, детектируемых через CRISPR-кассету бактерий / **А.Ю. Борисенко**, Ю.П. Джигоев, Н.П. Перетолчина, Л.А. Степаненко, В.А. Кузьминова, Л.А. Кокорина, Ю.М. Землянская, Н.А. Арефьева, В.И. Злобин // **Acta Biomedica Scientifica**. – 2018. – Т. 3. – № 5.– С. 49–53.
7. Арефьева Н.А. Детекция и анализ CRISPR-CAS-систем в геноме плазмиды PUC-1 из штамма *BACILLUS THURINGIENSIS* YC-10 / Н.А. Арефьева, Ю.П. Джигоев, **А.Ю. Борисенко**, Л.А. Степаненко, Н.П. Перетолчина, Ю.С. Букин, В.И. Чемерилова, О.Ф. Вятчина, О.А. Секерина, Ю.А. Маркова, Г.В. Юринова, В.П. Саловарова, А.А. Приставка, В.А. Кузьминова, А.С. Мартынова, В.И. Злобин //

Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2018. – Т. 26. – С. 3–17.

8. Арефьева Н.А. Биоинформационный поиск структур CRISPR/CAS-системы в геноме плазмиды PCT281 штамма *BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP. CHINENSIS* СТ-43 / Н.А. Арефьева, Ю.П. Джигоев, **А.Ю. Борисенко**, В.И. Чемерилова, О.Ф. Вятчина, О.А. Секерина, Л.А. Степаненко, Ю.А. Маркова, Г.В. Юринова, В.П. Саловарова, А.А. Приставка, В.А. Кузьминова, О.Н. Рева, В.И. Злобин // **Acta Biomedica Scientifica.** – 2018. – Т. 3. – № 5. – С. 33–38.

9. Перетолчина Н.П. Сравнительный анализ CRISPR- систем штаммов *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* IP32953 И IP31758 / Н.П. Перетолчина, **А.Ю. Борисенко**, Ю.П. Джигоев, В.И. Злобин // **Acta Biomedica Scientifica.** – 2018. – Т. 3, № 5. – С. 54–59.

10. Иванова Е.И. Поиск и анализ CRISPR-CAS системы в штамме *ESCHERICHIA COLI* HS и детектируемых спейсерами CRISPR- кассеты фаговых рас методами биоинформатики / Е.И. Иванова, Ю.П. Джигоев, **А.Ю. Борисенко**, Н.П. Перетолчина, Л.А. Степаненко, А.И. Парамонов, Е.В. Григорова, У.М. Немченко, Т.В. Туник, Е.А. Кунгурцева // **Вестник Российского государственного медицинского университета.** – 2018. – № 2. – С. 28–34. (Scopus, РИНЦ).

11. Ivanova E.I. The search and analysis of a CRISPR-Cas system in Escherichia coli HS with subsequent scanning for the corresponding phage races based on the spacers of the detected CRISPR array using bioinformatic methods / E.I. Ivanova, Yu.P. Dzhiyev, **A.Yu. Borisenko**, N.P. Peretolchina, L.A. Stepanenko, A.I. Paramonov, E.V. Grigorova, U.M. Nemchenko, T.V. Tunik, E.A. Kungurtseva // **Bulletin of Russian State Medical University.** – 2018. – № 2. С. 26–31. (Web of Science).

12. **Борисенко А.Ю.** Сравнительный анализ структур CRISPR/CAS-систем у штаммов *Staphylococcus aureus* и детектируемых ими фаговых рас методами биоинформатики / **А.Ю. Борисенко**, Н.А. Арефьева, Ю.П. Джигоев, Л.А. Степаненко, Н.П. Перетолчина, Ю.С. Букин, В.И. Чемерилова, О.Ф. Вятчина, О.А. Секерина, В.П. Саловарова, А.А. Приставка, В.И. Злобин // **Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология.** – 2020. – Т. 31. – С. 3–18.

Публикации в других журналах и сборниках:

13. **Борисенко А.Ю.** Биоинформационный алгоритм поиска сайтов CRISPR/CAS систем в геноме бактерий и *Staphylococcus aureus* / **А.Ю. Борисенко**, Ю.П. Джигоев, В.И. Злобин // **Природно-очаговые и другие актуальные инфекции Сибири и Дальнего Востока.** – 2015. – С. 22–23.

14. **Борисенко А.Ю.** Биоинформационные технологии для поиска и анализа CRISPR/CAS систем в геноме *Staphylococcus aureus* / **А.Ю. Борисенко**, А.И. Парамонов, Ю.С. Букин // **Экология и здоровье населения** сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых. ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований». – 2015. – С. 13–22.

15. **Борисенко А.Ю.** Биоинформационный алгоритм поиска и анализа *crispr / cas*-систем искрининга фагов через спейсеры CRISPR-кассет штаммов *Staphylococcus aureus* / **А.Ю. Борисенко**, Ю.П. Джигоев, В.И. Злобин, Н.П. Перетолчина, А.И. Парамонов, Л.А. Степаненко, О.В. Колбасеева, В.А. Кузьминова // **МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017** сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2017. – С. 478–479.

16. **Борисенко А.Ю.** Биоинформационный поиск и скрининг бактериофагов через спейсеры CRISPR/CAS-системы штамма *Staphylococcus aureus m13* / **А.Ю. Борисенко**, Ю.П. Джигоев, Н.П. Перетолчина, Л.А. Степаненко, В.М. Кузьминова, О.В. Колбасеева, Ю.М. Землянская, И.А. Филатова, В.И. Злобин // **Актуальные проблемы науки Прибайкалья.** – 2017. – С. 45–49.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю заслуженному деятелю науки Российской Федерации, академику РАН, доктору медицинских наук, профессору **Злобину Владимиру Игоревичу** за всестороннюю помощь на всех этапах выполнения диссертации; к.б.н., ведущему научному сотруднику НИИ БМТ ИГМУ **Джигоеву Юрию Павловичу** за научные консультации по CRISPR-технологиям; к.м.н., старшему научному сотруднику НИИ БМТ ИГМУ **Степаненко Лилии Александровне** за практическую помощь при молекулярно-генетических исследованиях; к.м.н., доценту кафедры патологической физиологии и клинической лабораторной диагностики **Карноуховой Ольге Геннадьевне** за консультации и помощь в бактериологических исследованиях; старшему научному сотруднику лаборатории геносистематики Лимнологического института СО РАН **Букину Юрию Сергеевичу** за квалифицированную помощь в освоении биоинформационных компьютерных технологий.